

⑩ 日本国特許庁(JP) ⑪ 特許出願公開
⑫ 公開特許公報(A) 平3-47097

⑬ Int. Cl.³ 識別記号 庁内整理番号 ⑭ 公開 平成3年(1991)2月28日
C 12 Q 1/68 A 6807-4B
C 12 M 1/00 A 8717-4B
G 01 N 27/447 7235-2C G 01 N 27/26 3 0 1 A
審査請求 未請求 請求項の数 11 (全7頁)

⑮ 発明の名称 ハイブリダイゼーション方法、これを用いた遺伝子変異検出方法及びその装置
⑯ 特 願 平1-178933
⑰ 出 願 平1(1989)7月13日
⑱ 発 明 者 堀 田 二 郎 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
⑲ 発 明 者 永 井 啓 一 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
⑳ 発 明 者 時 永 大 三 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内
㉑ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地
㉒ 代 理 人 弁理士 平木 祐輔 外1名

9月 堀 田 二 郎

1. 発明の名称
ハイブリダイゼーション方法、これを用いた遺伝子変異検出方法及びその装置
2. 特許請求の範囲
1. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション方法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめることを特徴とする核酸試料のハイブリダイゼーション方法。
2. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行なわせ、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸試料を電気泳動によって移動せしめて上記電気泳動担体中から除去することを特徴とする遺伝子変異検出方法。
3. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼー

ション反応を用いた遺伝子変異検出法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行なわせ、次いで前記電気泳動担体を加温した後、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸試料を電気泳動によって移動せしめて上記電気泳動担体中から除去することを特徴とする遺伝子変異検出方法。
4. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行なわせ、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸試料を電気泳動によって移動せしめて電気泳動担体中から除去し、さらに核酸抽出液を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行なわせ、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸抽出液

特開平3-47097 (2)

酸プローブを電気泳動によって移動せしめて電気泳動担体中から除去した後、上記核酸試料と結合した標識核酸プローブの標識を検出することを特徴とする遺伝子変異検出方法。

5. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行わせ、次いで前記電気泳動担体を加温した後、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸試料を電気泳動によって移動せしめて上記電気泳動担体中から除去し、さらに標識核酸プローブを電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行わせ、次いで上記電気泳動担体を加温した後、上記核酸プローブと結合しなかった上記標識核酸プローブを電気泳動によって移動せしめて電気泳動担体中から除去した後、上記核酸試料と結合した標識核酸プローブの標識を検出することを特徴とする

9. 計測手段が正極側電解液中の蛍光又は光の吸収を計測する手段であって、前記計測手段によって計測される正極側電解液中の蛍光体又は色素を濃縮するための、電解液は通過するが蛍光体又は色素は透過しない膜を設けたことを特徴とする請求項8記載の遺伝子変異検出装置。

10. 上記電気泳動担体の温度をコントロールする手段を具備したことを特徴とする請求項8又は9記載の遺伝子変異検出装置。

11. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション方法又は核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法に用いる核酸プローブを固定した電気泳動担体。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は核酸試料のハイブリダイゼーション方法、この方法を用いた遺伝子変異検出方法及びその装置に関し、特に高速で自動化可能な遺伝子変異検出方法及び装置に関する。

遺伝子変異検出方法。

6. 標識は蛍光体又は色素であり、これらを電気泳動担体中で検出することを特徴とする請求項4又は5記載の遺伝子変異検出方法。
7. 標識は酵素であり、当該酵素による酵素反応によって生成する蛍光体又は色素を電気泳動担体中で検出するか、あるいは電気泳動によって上記電気泳動担体中から外に移動せしめて検出することを特徴とする請求項4又は5記載の遺伝子変異検出方法。
8. 核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出装置において、核酸試料をハイブリダイゼーションさせるための核酸プローブを固定した電気泳動担体と、上記核酸プローブを固定した電気泳動担体に正極側電解液と負極側電解液を介して直流電圧を印加する直流電圧印加手段と、上記電気泳動担体中又は上記正極側電解液中の蛍光又は光の吸収を計測する計測手段とを具備したことを特徴とする遺伝子変異検出装置。

(従来の技術)

核酸 (DNA又はRNA) 試料又はDNA (RNA) プローブ (標的DNA (RNA) と相補的な塩基配列を持つDNA (RNA) 断片) のいずれか一方を固相に固定したハイブリダイゼーション反応を用いる従来の遺伝子変異検出法は、プロシーディングス オブ ナチュラルアカデミー オブ サイエンス ユー エス エー、80巻 (1983年) 第278頁から282頁 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, (1983), pp. 278 ~ 282) に記載されている。

この方法は、まず、電気泳動によって分子量分離したDNA断片試料をニトロセルロース膜上に転写、固定した後、この膜をDNAプローブを含む溶液に浸してハイブリダイゼーション反応を行なう。ハイブリダイゼーション反応では、塩基配列の相補性が高い程、DNA断片試料とDNAプローブは強く結合し、高い温度でも解離することがない。そこで、次に、DNA断片試料がDNAプローブと完全な相補性をもつ場合には解離せず、

特開平3-47097 (3)

相溶性がないか又は相溶性が不完全な場合には解離するような温度で洗浄を行なう。DNA断片試料がDNAプローブと完全な相溶性を持つものである場合には、DNAプローブは膜に結合したまま残って検出されるが、そうでない場合には、DNAプローブは膜から洗い流されて検出されない。以上のように、この方法では、DNA断片試料がDNAプローブと完全な相溶性を持つか否かを判定できる。したがって、正常な標的遺伝子と完全な相溶性を持つDNA断片をDNAプローブとすることにより、DNA断片試料中の標的遺伝子が正常なものか、あるいはポイントミューテーション、挿入、欠失等の変異を含む異常なものかを判定でき、遺伝子の変異を検出できる。

(発明が解決しようとする課題)

上記の従来法では、ハイブリダイゼーション反応がニトロセルロース膜(固相)に固定されたDNA断片試料と、溶液中のDNAプローブの受動的拡散によって起こるため、反応速度が遅いという問題点があった。また、反応時及び洗浄時には、

各々の溶液の注入、排出という自動化しにくい動作が含まれているという問題点があった。

本発明の目的は、ハイブリダイゼーションの反応速度が速く、しかも溶液の注入、排出等の自動化しにくい動作の少ない、高速で自動化容易なハイブリダイゼーション方法、該方法を用いた遺伝子変異検出法及びそれに用いる装置を提供することにある。

(課題を解決するための手段)

上記目的を達成するために、本発明では、DNAプローブを電気泳動担体に固定し、その上下に緩衝液を介して2つの電極を配置して、電気泳動により核酸断片試料等を強制的に移動させて、ハイブリダイゼーション反応や洗浄を行なうようにした。

即ち、本発明は、核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション方法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめることを特徴とする核酸試料のハイブリダイゼーション方法で

ある。このハイブリダイゼーション方法によれば、DNAプローブを固定した電気泳動担体上に核酸試料を強制的に移動させるものであるから、ハイブリダイゼーション反応が、上記従来法に比して速く、この反応を短時間で完了することができる。

さらに本発明は、核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法において、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行わせ、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸試料を電気泳動によって移動せしめて上記電気泳動担体中から除去することを特徴とする遺伝子変異検出方法である。

上記遺伝子変異検出法においては、2種類の核酸プローブ、即ち、電気泳動担体に固定する核酸プローブ(固定化プローブ)と、前記固定化プローブに結合した核酸試料に更にハイブリダイズする標識化された第2の核酸プローブ(標識プローブ)を用いて行うことができる。即ち、この遺伝

子変異検出法は、核酸プローブを電気泳動担体中に固定し、核酸試料を電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行わせ、上記核酸プローブと結合しなかった上記核酸試料を電気泳動によって移動せしめて電気泳動担体中から除去し、さらに標識核酸プローブを電気泳動によって電気泳動担体中に移動せしめてハイブリダイゼーション反応を行わせ、上記核酸プローブと結合しなかった上記標識核酸プローブを電気泳動によって移動せしめて電気泳動担体中から除去した後、上記核酸試料と結合した標識核酸プローブの標識を検出することにより行うことができる。

また、上記いずれの方法においてもハイブリダイゼーション反応を行わせた後、電気泳動担体を加温する工程を加えることができる。加温する温度は、核酸試料が核酸プローブと完全な相溶性をもつ場合には解離せず、相溶性がないか又は相溶性が不完全な場合には解離するような温度が好ましい。この温度は、核酸試料と核酸プローブの長

特開平3-47097 (4)

さと塩基配列及び検出しようとする遺伝子の変異によって種々異なるが、例えば、 β -グロビン遺伝子中のポイントミューテーションを19塩基長の核酸プローブで検出する場合は55℃が好ましい。そして、この電気泳動担体の加熱により、核酸プローブと核酸試料とのハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法の精度を高めることができる。

上記核酸核酸プローブの標識物質としては、検出可能なものであればいずれでもよく、 ^{32}P 等のラジオアイソトープでもよいが、好ましくは蛍光体又は色素或いは反応により蛍光体又は色素を生成する酵素が用いられ、具体的には例えばフルオレセイン イソチアシネート (FITC)、エステラーゼ等が用いられる。そして、これらの蛍光体又は色素の計測は、上記電気泳動担体中あるいは電気泳動により上記電気泳動担体中から外に移動せしめたものについてのいずれにおいても行うことができる。

さらに、本発明は、上記遺伝子変異検出方法を

動担体の温度をコントロールするためのコントロール手段を備えることができる。

さらに本発明は、上記核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション方法又は核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出法に用いる核酸プローブを固定した電気泳動担体に係るものである。

〔作用〕

電気泳動担体の上面にDNA断片試料を添加した後、2つの電極間に直流電圧を印加して、DNA断片試料を強制的に担体中に移動させる。これにより、DNA断片試料を受動的に拡散させる場合よりも、ハイブリダイゼーション反応を速くできる。

また、ハイブリダイゼーション反応で結合しなかったか又は結合が弱かったDNA断片試料を電気泳動により除去する。これにより、検体の注入、排出等による洗浄操作が不要な、自動化に適した方法を実現できる。

さらに、ハイブリダイゼーション反応物の標識

実施するための遺伝子変異検出装置に係わり、核酸プローブと核酸試料のハイブリダイゼーション反応を用いた遺伝子変異検出装置において、核酸試料をハイブリダイゼーションさせるための核酸プローブを固定した電気泳動担体と、上記核酸プローブを固定した電気泳動担体に正極側電解液と負極側電解液を介して直流電圧を印加する直流電圧印加手段と、上記電気泳動担体中又は上記正極側電解液中の蛍光又は光の吸収を計測する計測手段とを具備したことを特徴とする遺伝子変異検出装置である。また、この遺伝子変異検出装置は、計測手段が、正極側電解液中の蛍光又は光の吸収を計測する手段である場合は、前記計測手段によって計測される正極側電解液中の蛍光体又は色素を濃縮するための、電解液は通過するが蛍光体又は色素は透過しない膜を設けることができる。この膜は上記機能を備えるものであればいずれでもよいが、例えば石英製のポーラスガラス膜が用いられる。

また、この遺伝子変異検出装置には上記電気泳

物質からの蛍光又は光の吸収の計測は上記電気泳動担体あるいは正極側の電解液中のいずれにおいても行うことができ、また、後者の正極側の電解液中で計測する場合は、蛍光体又は色素を濃縮する膜を備えることにより計測の精度が高められる。
〔実施例〕

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。但し、本発明はこれらの実施例により限定されるものでない。

実施例1

本実施例を第1図(a)、(b)により説明する。

まず、DNAプローブを固定した電気泳動担体1は以下のようにして調製する。DNAプローブは、ヒト β -グロビン遺伝子の5'末端から14~32番目の塩基配列と完全に相補的なDNA断片(3'-CAGGACTCCTCTTCAGACC-5')を、現在広く用いられているフォスフォアミダイド法で合成した。ただし、合成の最終ステップ、すなわち5'末端のグアニン(G)を付加するステップでは、デオキシグアニシンのかわりに5'末端にアミノ基をもつデオキ

特開平3-47097 (5)

シグナノシンを用いるL.H. Smithらの方法により、DNA断片の5'末端にアミノ基を導入した。次に、このDNAプローブを高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製した後、2.5%アクリレイン水溶液に加えて氷浴下30分間反応させた。これをPBS緩衝液でよく透析した後、さらに5%アクリルアミド-N, N'-メチレンビスアクリルアミド溶液(アクリルアミド:N, N'-メチレンビスアクリルアミド=20:1)、最終濃度0.08%のN, N, N', N'-テトラメチルエチレンジアミン、最終濃度0.1%の過硫酸アンモニウムを加えてガラス管2に注入し、ゲル化させて電気泳動担体1とした。

DNA断片試料としては、変異を含まない正常人のβ-グロビン遺伝子(β^A)と5'末端から20番目のアデノシン(A)がチミン(T)に変異した(ポイントミューテーション)、鎌状赤血球貧血症患者のβ-グロビン遺伝子(β^S)を制限酵素BamHIで切断したもの(β-グロビン遺伝子の5'末端付近を含む、長さ約1800塩基対の断片)を使用した。

上記DNA断片試料を加熱変性させて一本鎖DNA

NAとしてから、温度コントローラ3によって45℃に保たれているDNAプローブを固定した電気泳動担体1の上端に注入し、上部電解液槽4中の負極6と下部電解液槽7中の正極9の間に直流電源10で電圧を印加した。これにより、DNA断片試料は電気泳動担体1の中へ強制的に電気泳動されるため、電気泳動を行わずに受動的に拡散させる場合に比べて、ハイブリダイゼーション反応を速く進めることができる。

次に、電気泳動担体1の温度を温度コントローラ3によって55℃に変更してから、再び2つの電極6、9の間に電圧を印加し、DNAプローブと完全な相補性を持たないために解離したDNA断片試料を電気泳動により除去した。

さらに、電気泳動担体の温度を45℃にもどしてから、エステルアゼで標識した第二のDNAプローブを電気泳動担体1の上端に注入し、電気泳動した。このDNAプローブ(標識プローブ)は、電気泳動担体1に固定したプローブ(固定化プローブ)と同様にフォスフォアミダイド法で合成し

たDNA断片(5'-CCACTTGCACCTACTTAC-3')の5'末端をエステルアゼで標識したものであるが、固定化プローブとは異なる部位、すなわちβ-グロビン遺伝子の5'末端から53~72番目の塩基配列に相補的である。したがって、DNA断片試料が固定化プローブに結合して電気泳動担体1中に残っていれば、標識プローブもDNA断片試料の別の部位に結合して電気泳動担体1中に残るが、DNA断片試料が残っていないければ、標識プローブは電気泳動担体1中に残らず通過する。

最後に、標識酵素エステルアゼの基質であるPDA(フルオレセインジアセテート)を同様に電気泳動担体1の上端に注入して電気泳動した後、酵素反応で生じた蛍光物質フルオレセインの蛍光を、電気泳動担体1中で測定した。

キセノンランプの光源11から出た光を干渉フィルター12に通して490nmの波長の光を選択した後、レンズ13で集光して電気泳動担体1に励起光を照射した。励起光に対して90°の方向から、レンズ17、カットオフフィルター18、干渉フィルター19

を通して、510nm近傍の波長の光を選択的にフォトマル20で検出した。なお、入射窓14の反対側に窓16を設け、電気泳動担体1を通過した励起光を外部に導くことにより、散乱光の影響を少なくした。フォトマル20の出力は増幅器21で増幅した後、レコーダ22で記録した。

測定の結果、DNA断片試料が変異を含まない正常人のβ-グロビン遺伝子(β^A)の断片で、固定化DNAプローブと完全な相補性をもつ場合には、蛍光が検出されたが、DNA断片試料が変異(ポイントミューテーション)を含む鎌状赤血球貧血症患者のβ-グロビン遺伝子(β^S)の断片で、固定化DNAプローブと1塩基だけ相補性をもたない場合には、蛍光は検出されなかった。確認のために、固定化DNAプローブをβ^A遺伝子に完全な相補性をもつもの(5'-CAGGACACCTCTTCAGACG-3')にかえて同様の測定を行なったところ、DNA断片試料がβ^A遺伝子の断片の場合には蛍光が検出されず、β^S遺伝子の断片の場合には蛍光が検出された。このように、変異を含む遺伝子断片

と含まない遺伝子断片を、蛍光が検出されるか否かによって区別できるため、 β -グロビン遺伝子断片中の変異（ポイントミューテーション）を検出することができた。

なお、本実施例では標識物質として酵素（エステラーゼ）を用い、酵素反応によって生成するPDAの蛍光を測定したが、標識物質としてFITC等の蛍光物質を用い、酵素や酵素反応を用いずに、直接その蛍光を測定してもよい。

以上のように、本実施例により、高速で自動化容易な遺伝子変異検出法及び装置を実現できた。

実施例2
次に、第2の実施例を第2図により説明する。本実施例と実施例1の違いは、蛍光物質フルオレセインの蛍光を、電気泳動担体1中ではなく、下部電解液8中で測定するところにある。前記実施例の最後のステップで、PDAを電気泳動により電気泳動担体1中に移動させた後、さらに電気泳動を続けて酵素反応で生じた蛍光物質フルオレセインを下部電解液8中に泳動させた。そして、フル

オレセインの蛍光を第2図に示す装置を用いて、下部電解液中で測定した。

本実施例によれば、実施例2と同様の効果に加えて、蛍光物質PDAを小容積の電解液中に濃縮できるため、さらに高感度な蛍光測定が可能であるという効果がある。

（発明の効果）

本発明によれば、DNA断片試料を電気泳動により強制的に電気泳動担体中に移動させるので、従来のニトロセルロース膜で用いた方法で受動的に拡散させる場合よりも、ハイブリダイゼーション反応を速くでき、短時間で完了できる。また、ハイブリダイゼーション反応で結合しなかったか又は結合が弱かったDNA試料を、溶液の注入、排出等による洗浄操作を用いずに、電気泳動によって容易に除去することができる。したがって、本発明によれば高速で自動化容易な遺伝子変異検

特開平3-47097 (6)

出方法を実現できる。更に本発明は、標識物質の蛍光体又は色素を濃縮することにより計測感度を高めることができる。

実施例3
次に、第3の実施例を第3図により説明する。本実施例と実施例2の違いは、電気泳動担体1の下端と下部電解液8の間にアクリル製の膜保持具23に取り付けたポーラスガラス膜24を配置することにより、小容積の電解液槽25を構成した点にある。上記ポーラスガラス膜24は、ゾルゲル法でテトラメトキシシランをメタノールと水溶液中で反応させたもので、電解液中の電解質は透過させるが、蛍光体は透過させないという性質をもつ石英ガラスである。したがって、酵素反応によって生成した蛍光体PDAは小容積の電解液槽25中に濃縮される。本実施例では、上記過程によって濃縮さ

実施例3

れた蛍光体を含む電解液をガイド穴26を通してビベット27を用いて蛍光セル28に導いた。ビベット27は回転上下機構29に保持した。蛍光セル28中の蛍光体は、第2図に示したのと同様な光学系で蛍光計測した。

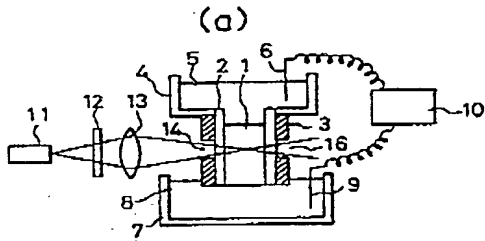
4. 図面の簡単な説明

第1図(a)、(b)は各々本発明の第一の実施例で用いた装置の縦断面図と横断面図、第2図は本発明の第二の実施例で用いた装置の縦断面図、第3図は本発明の第三の実施例で用いた装置の縦断面図の一部拡大図である。

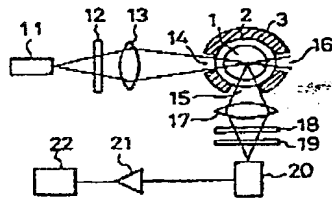
1…電気泳動担体、2…ガラス管、3…温度コントローラ、4…上部電解液槽、5…上部（負極側）電解液、6…負極、7…下部（正極側）電解液槽、8…下部（正極側）電解液、9…正極、10…直流電源、11…光源、12、19…干渉フィルター、13、17…レンズ、14…入射窓、15…検出窓、16…窓、18…カットオフフィルター、20…フォトマル、21…増幅器、22…レコーダー、23…膜保持具、24…ポーラスガラス膜、25…小容積の電解液槽、26…ガイド穴、27…ビベット、28…蛍光セル、29…回転上下機構。

特開平3-47097 (7)

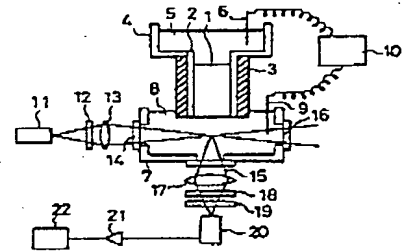
第 1 圖



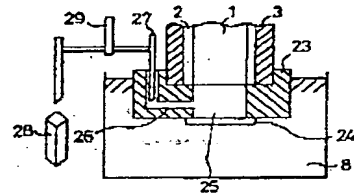
(b)



第 2 圖



第 3 圖



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.